

高密度脂蛋白对 ERK1/2 表达及其磷酸化的影响

易光辉, 王 燕, 周军民¹, 莫中成, 杨永宗

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001; 1. 中山大学肿瘤研究所)

[关键词] 分子生物学; 高密度脂蛋白对 ERK1/2 表达的影响; 免疫印迹技术; 丝裂素活化蛋白激酶; 细胞培养

丝裂素活化蛋白激酶是信号从细胞表面转导到细胞内部的重要传递者, 通过磷酸化活化转录因子而调控特定基因的表达。本实验观察了人高密度脂蛋白对 U937 细胞信号转导分子 ERK1/2 表达水平及其磷酸化的影响。人单核-巨噬细胞株 U937 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 在 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。待细胞长至 5×10^5 时, 换无血清的 RPMI 1640 培养基 5 mL。高密度脂蛋白制备方法, 取新鲜抗凝血浆, 用超速离心机进行密度梯度离心, 收集密度 1.063~1.210 g/cm³ 组分, PBS 透析后冷藏备用。SDS-PAGE 采用 12% 的分离胶, 浓缩胶的电流为 10 mA, 分离胶的电流为 15 mA, 每孔加约 50 μg 的样本。在转膜前, 每一批样本用考马斯亮蓝 R250 染色以检测提取细胞蛋白情况。转膜采用 100 mA 的电流, 时间为 2 h, 膜为聚偏氟乙烯膜, 用前用甲醇浸泡 10 min 左右, 封闭液为 Pierce 公司产品, 漂洗液为 PBS+50% 的吐温, 一抗稀释度为 1:200, 二抗稀释度为 1:1 000, 温育时间均为室温 1 h, 显色液为 Pierce 公司产品。其余步骤按常规操作。Western blot 实验结果显示, 高密度脂蛋白刺激 ERK1/2 表达, 并诱导 ERK1/2 磷酸化水平增加。ERK1/2 磷酸化诱导过氧化体增殖物激活型受体 γ 的磷酸化, 而丝裂素活化蛋白激酶特异性抑制剂则阻止过氧化体增殖物激活型受体 γ 的磷酸化。本实验结果提示, 高密度脂蛋白诱导细胞胆固醇流出作用有赖于 ERK1/2 的参与, 同时还可能涉及到过氧化体增殖物激活型受体 γ 的表达上调, 以及 LXR α 和三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 的参与。

(此文编辑 曾学清)